สารเสาวภาปีที่ 5 ฉบับที่ 1-2 มกราคม , กรกฎาคม 2549

แอนติเจนดิลิเวอรี่ (Antigen delivery)

ทรงศรี เกษมพิมลพร[1]

บทนำ

ชื่อหัวข้ออาจทำให้เรานึกถึงพิซซ่าดิลิเวอรี่ คริสดิลิเวอรี่ หรือธรรมะดิลิเวอรี่ที่กำลังฮิต ตามความหมายของดิลิเวอรี่น่าจะหมายถึงการนำส่งถึงที่ (บ้าน) แต่สำหรับแอนติเจนดิลิเวอรี่พอจะอนุมานได้ว่าน่าจะหมายถึงการนำส่งแอนติเจนไปในที่ที่มันควรจะไปเพื่อช่วยในการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกาย

กระบวนการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนต้องอาศัย activated antigen presenting cells (APC) โดย APC หรือ innate immune response cells เช่น macrophages, dendritic cells (DC) เป็นต้น จะกลืน (engulf) สิ่งแปลกปลอมผ่านกระบวนการที่เรียกว่า phagocytosis หลังจากนั้น APC จะเคลื่อนไปที่ lymph nodes ที่มี T cells (adaptive immune response cells) อยู่รอสัญญาณกระตุ้นการทำงาน ใน lymp nodes นั้น APC จะย่อยสิ่งแปลกปลอมให้แสดงเป็นแอนติเจนไปปรากฏที่ผิวของ APC โดยไปรวมคู่กับ receptor ที่เรียกว่า major histocompatibility complex (MHC) แล้วกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ effector T cells ในลำดับต่อมา[(1)] วัคซีนประเภท recombinant proteins ที่ถึงแม้มีความบริสุทธิ์สูงแต่มักมี immunogenicity ต่ำอันเนื่องมาจากการไม่เป็นแอนติเจนที่ดีที่ให้ activation signals ที่จะนำเข้าสู่การทำงานของ APC สิ่งหนึ่งที่สำคัญและมักถูกมองข้ามคือการพัฒนาสูตรวัคซีนที่สามารถจะนำ antigenic material ในวัคซีนเข้าสู่ระบบภูมิคุ้มกัน ระบบการนำส่งแอนติเจน (antigen delivery system) นี้จะเป็นการช่วยนำเสนอแอนติเจนที่ทำให้การตอบสนองทั้งแบบแอนติบอดีและแบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ดีขึ้น การเลือกระบบการนำส่งแอนติเจนต้องคำนึงถึงความปลอดภัยต่อผู้ใช้ ระบบการนำส่งจะต้องสามารถสลายตัวได้โดยกระบวนการทางชีวภาพโดยไม่ตกค้างในเนื้อเยื่อจนก่อให้เกิดปัญหาในระยะต่อมา นอกจากนี้ต้องไม่มีคุณสมบัติเป็น immunogen เพื่อหลีกเลี่ยงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อตัวนำส่งแอนติเจน[(2)]

สูตรตำรับ (formulations) ที่ใช้เป็นระบบการนำส่งแอนติเจนในวัคซีน คือ adjuvant formulations ซึ่งมีหลายชนิด เช่น lipid based systems, polymer based systems และ mineral salt based systems ปัจจุบัน adjuvanted human vaccines ที่ขึ้นทะเบียนเกือบทั้งหมดจะเป็น aluminium-based adjuvants (mineral salt based systems) ซึ่งจะช่วยเหนี่ยวนำการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบแอนติบอดีได้ดี แต่อาจจะไม่เหมาะกับวัคซีนที่ใช้เพื่อการรักษากรณีที่เชื้ออยู่ภายในเซลล์ (intracellular pathogens) การติดเชื้อแบบเรื้อรัง

[1] ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา

(chronic infections) หรือมะเร็ง ซึ่งภูมิคุ้มกันประเภท cellular immunity ($CD4^+$ และ $CD8^+$ T cells) จะมีบทบาทสำคัญในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา นักวิทยาศาสตร์พยายามที่จะหา adjuvants ชนิดใหม่สำหรับใช้ในคนที่สามารถชักนำการตอบสนองทั้งแอนติ บอดีและภูมิคุ้มกันด้านเซลล์โดยเฉพาะ cytotoxic T lymphocyte (CTL) ซึ่ง adjuvants ชนิดใหม่ๆ นี้ต้องเผชิญกับสิ่งท้าทาย 3 ข้อคือ ความปลอดภัย (safety), การมีปฏิกิริยาสร้างภูมิคุ้มกัน (immunogenicity) และ ประสิทธิผลทางคลินิก (clinical efficacy) งานวิจัยเกี่ยวกับ adjuvantsชนิดใหม่มีทีท่าให้ผลไปในทางที่ดี ซึ่งบทความนี้จะกล่าวถึงเฉพาะ adjuvants ชนิด lipid based systems เท่านั้น

Adjuvant formulations

'adjuvant' มาจากภาษาลาติน *adjuvare* ที่แปลว่า 'to help' ถ้าจะอธิบายในเชิงวัคซีนก็จะหมายถึงสารประกอบใดๆที่ช่วยเร่ง (accelerate) เพิ่ม (enhance) หรือขยายเวลา (prolong) การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจน จากการศึกษาพบว่า adjuvant ที่เป็น solution formulations จะเป็นตัวนำส่งแอนติเจนไม่ดีเท่ากับ adjuvant ที่เป็นอนุภาค (particulate formulations)[3] แบบอนุภาคนี้จะสังเคราะห์ขึ้นหลายแบบแยกชนิดตามส่วนประกอบทางเคมี เช่น lipid based systems, polymer based systems และ mineral salt based systems

โดยทั่วไปเมื่อร่างกายได้รับแอนติเจนโดยเฉพาะเชื้อไวรัส เซลล์ที่เรียกว่า APC จะทำการกลืนแอนติเจนแล้วย่อยเป็น antigenic determinant และ antigenic determinant ดังกล่าวจะไปปรากฏขึ้นที่ผิวของ APC โดยไปรวมคู่ใกล้ๆกับโมเลกุล class 1 ของ MHC ซึ่งแอนติเจนและโมเลกุล class 1 ของ MHC บน APC จะทำงานร่วมกันในการกระตุ้น antigen receptor บน CTL กระบวนการทำงานของ APC นี้เป็นการประสานทางกายภาพ (physical link) ระหว่าง innate และ adaptive immune responses แอนติเจนที่เป็น peptides จะกระตุ้น MHC class 1-restricted CTL responses ได้ไม่ดีเพราะไม่สามารถเข้าไปถึง cytosol (ส่วนที่เป็นของเหลวของ cytoplasm) ของ APC นอกจากจะอาศัยตัวนำส่งแอนติเจนให้สามารถเข้าไปใน cytoplasm แล้ว ตัวนำส่งแอนติเจนหรือ adjuvant ชนิดที่เป็นอนุภาคจะมีขนาดใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสจึงเป็นเป้าให้ APC เข้ามากินด้วย

Lipid based systems

Adjuvants แบบอนุภาคชนิด lipid based systems จะแยกเป็น class ตามปฏิกิริยากับน้ำ[4] ดังนี้

Class I: ไขมันไม่ละลายในชั้นของน้ำ (aqueous phase) แต่จะแผ่เป็นชั้นฟิล์มระหว่างอากาศกับของเหลว

Class II: ไขมันละลายในชั้นของน้ำน้อยมากแต่จะขยายตัวเป็นชั้นฟิล์มผลึกของเหลว

Class III: ไขมันละลายในชั้นของน้ำจะฟอร์มตัวเป็นสารละลายของอนุภาค (micellar solutions)

ระบบการนำส่งแอนติเจนมักจะประกอบด้วยส่วนผสมของ lipids ต่าง classes เช่น

liposomes เป็นการผสมระหว่าง class I lipid cholesterol กับ class II lipid phosphatidylcholine เป็นต้น

Adjuvants based on class I lipids

Solid lipid nanoparticles (SLN)

Lipid matrices ของ SLN ประกอบไปด้วย fats หรือ waxes ที่จะรวมตัวกับแอนติเจนช่วยป้องกันการเสียสภาพจากสารเคมีและจากทางกายภาพ ส่วนประกอบของ SLN แสดงในตารางที่1 มีการใช้ SLN เป็น adjuvant ในสัตว์ เช่น แกะ พบว่าให้ระดับแอนติบอดีใกล้เคียงกับการใช้ aluminium hydroxide เป็น adjuvant เทียบได้ประมาณ 40-80% ของระดับแอนติบอดีเมื่อใช้ Freund's incomplete adjuvant (FIA) และไม่พบอาการเป็นพิษเมื่อใช้ในสัตว์[5]

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของ SLN

Compound	**Function**	**Lipid class**
Paraffin or glyceride	Structural lipid	I
Additional lipid, solid or liquid phase	Disrupt crystal structure of lipid to increase entrapment of bioactive	I
Surfactant	Disperse lipid during preparation	III
Bioactive molecule (e.g. antigen, drug, cytokine)	'Payload'	-
Buffer	Bulk phase	-

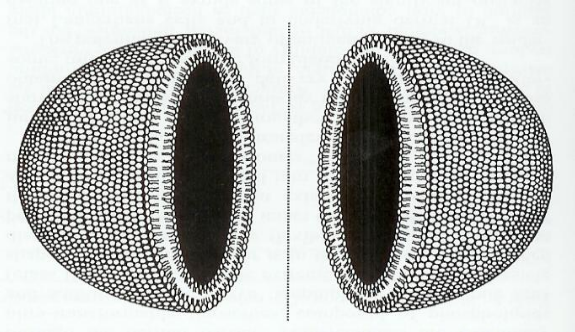
Adjuvants based on class II lipids

Liposomes

Liposomes มีโครงสร้างเป็นถุงปิดเล็กๆ ภายนอกเป็น hydrated phospholipids สองชั้น คือ ระหว่างชั้น phospholipids จะเป็นชั้นของน้ำ ซึ่งทั้งหมดจะล้อมส่วน aqueous core ไว้ (ภาพที่ 1) มีการนำ liposomes ไปใช้ประโยชน์หลากหลาย เช่น ใช้เป็นส่วนประกอบเครื่องสำอาง หรือ ใช้เป็นตัวนำส่งวัคซีน เป็นต้น

Liposomes ที่ใช้เป็นตัวนำส่งยาจะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 25 นาโนเมตร จนถึงหลายไมโครเมตร สามารถเตรียมจาก phospholipids ชนิดเดียวกับที่มีใน mammalian cell membranes จึงเป็น adjuvants ที่ non-toxic และ non-immunogenic[6]

นอกจากนี้มีการเพิ่ม branched chain mannose moiety บนผิวของ liposomes จะช่วยเพิ่มการกินของ APC ทำให้การกระตุ้น CTL มีมากขึ้นในลำดับต่อมา[7] ส่วนประกอบทั่วไปของ liposomes แสดงในตารางที่ 2



ภาพที่1 แผนภาพของ liposome ที่ตัดแยกออกเห็นส่วนที่เป็น aqueous core และ phospholipid bilayers

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของ liposome

Compound	**Function**	**Lipid class**
Phospholipids (e.g. phosphatidylcholine)	Formation of bilayers	II
Cholesterol (optional)	Reduce permeability and flexibility of bilayer	I
Bioactive molecule (e.g. antigen, drug, cytokine)	'Payload'	-
'Targeting' moiety (e.g. polyethylene glycols, antibodies, receptor ligands)	Alter uptake of vesicles by cells	-
Buffer	Hydration of phospholipids, bulk phase	-

Transfersomes

เป็นตัวนำส่ง bioactive molecules หรือแอนติเจนที่พัฒนาขึ้นเพื่อส่งผ่านเข้าทางผิวหนัง จัดเป็น liposomes ที่เปลี่ยนรูปได้ คือประกอบด้วย phospholipids และเพิ่มส่วนที่เป็น edge active (ตารางที่ 3) ทำให้มีรูปร่างเป็นถุงยืดหยุ่นสามารถแทรกซึมเข้าชั้นผิวหนังโดยฝ่าแรงของ hydrostatic gradient ที่ผิวเข้าไปได้[8] การนำส่งแอนติเจนตรงเข้า epidermal Langerhans cells และ dermal DC ที่อยู่ข้างใต้ลงมาเป็นการหลีกสิ่งกีดขวางการ uptake โดย DC ได้ดีกว่าการนำส่งแบบ systemic delivery

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของ transfersome

Compound	**Function**	**Lipid class**
Phosphatidylcholine	Main bilayer lipid	II
Sodium cholate and sodium dodecyl sulphate	'Edge-active' lipid	III
Bioactive molecule (e.g. antigen, drug, cytokine)	'Payload'	-
Buffer	Hydration of lipids, bulk phase	-

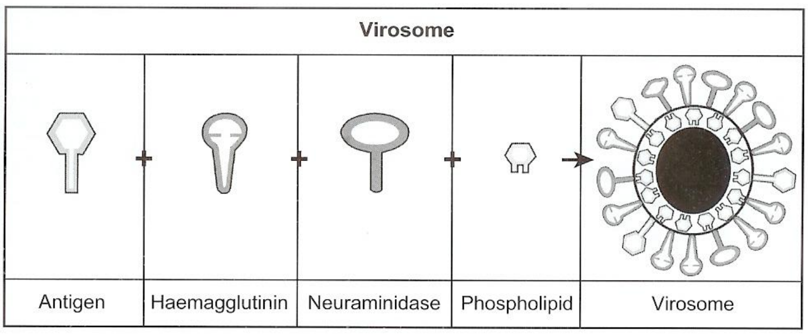
Niosomes

เป็นถุงที่ประกอบด้วย surfactant สังเคราะห์ที่ฟอร์มตัวเป็น non-ionic bilayer[9] โครงสร้างเหมือน liposomes แต่ surfactant ที่ใช้มีข้อดีกว่า phospholipids คือราคาถูกกว่าและมีความคงสภาพทางเคมีสูงกว่า phospholipids ธรรมชาติ[10]

Virosomes มีลักษณะเหมือน envelopes ของไวรัส เตรียมจาก phospholipids และ glycoproteins ที่สกัดจากอนุภาคไวรัส สามารถนำแอนติเจนใส่เข้าไปใน virosomes บริเวณที่เป็น lipophilic หรือ hydrophilic regions ทั้งนี้ขึ้นกับคุณสมบัติการละลายของแอนติเจน โครงสร้างของ virosomes เหมือน liposomes แต่มีการเพิ่มส่วนประกอบของไวรัส เช่น haemagglutinin และ neuraminidase ส่วนประกอบของ virosomes แสดงในตารางที่ 4 ตัวอย่างของวัคซีนคนที่ใช้ virosome technology คือ Epaxal เป็นวัคซีนป้องกันไวรัสโรคตับอักเสบ ของบริษัท Berna Biotech (Switzerland) ที่ใช้ virosomes ที่ประกอบไปด้วย purified influenza antigens, haemagglutinin และ neuraminidase บนผิวของ virosomes โดยยึดอยู่กับชั้น phospholipids bilayer (ภาพที่ 2) วัคซีนนี้มีความทนทานและสามารถกระตุ้นการตอบสนองทั้ง T-และ B-cells ได้ดี[11] โดยที่ virosomes สามารถนำแอนติเจนเข้าสู่ cytoplasm ได้หลังจากการ fusion เข้ากับ endosomal membrane หรือ receptor mediated endocytosis การนำส่งแอนติเจนเข้า cytosol ของ APC ได้จะนำไปสู่ MHC class I presentation pathway ซึ่งมีผลต่อการตอบสนองของ CD 8^+ T-cells ในลำดับต่อมา[12]

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของ virosome

Compound	Function	Lipid class
Phospholipid	Main bilayer lipid	II
Haemagglutinin/neuraminidase	Mediates fusion with cellular endosomal membrane	-
Antigenic protein or peptide	'Payload'	-
Buffer	Hydration of lipid, bulk phase	-



ภาพที่ 2 แผนภาพส่วนประกอบของ **virosome** ที่ใช้ใน **human hepatitis vaccine**

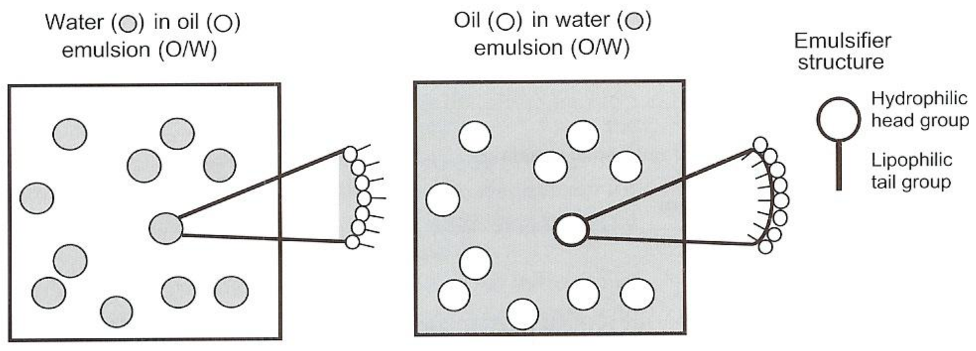
Adjuvants based on class III lipids

Emulsions

Emulsion คือส่วนประกอบของของเหลวสองชนิดคือ oil และน้ำที่ไม่ละลายเข้ากัน มีลักษณะเป็น oil in water emulsion คือ oil จะแยกกระจายตัวออกจากชั้นน้ำ หรือในทางตรงข้าม water in oil emulsion ที่น้ำจะแยกกระจายตัวออกจากชั้น oil (ภาพที่ 3) สิ่งที่ช่วยให้ oil หรือ น้ำที่แยกกระจายตัวออกจาก bulk phase ให้คงตัวคือ emulsifier (surfactant) ที่จะหุ้มหยด oil หรือหยดน้ำนั้นๆไว้

Emulsions ที่ใช้เป็น adjuvants มานานและรู้จักกันดี คือ Freund's complete adjuvant (FCA) และ Freund's incomplete adjuvant (FIA) ซึ่งเป็น water-in-mineral oil emulsion ที่มีและไม่มี heat-killed mycobacteria ตามลำดับ (ตารางที่ 5) FCA เป็นหนึ่งใน adjuvants ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในงานวิจัยในสัตว์และมักใช้เป็น 'gold standard' เมื่อจะใช้เทียบกับ adjuvants สูตรตำรับอื่นๆ แต่เนื่องจากทั้ง FCA และ FIA มักจะก่อให้เกิดเนื้องอก (granulomas) บริเวณที่ฉีดเพราะการตกค้างของ mineral oil ที่ไม่เผาผลาญ การใช้ FCA และFIA จึงถูกจำกัดเฉพาะในสัตว์เท่านั้น[13]

MF59 เป็น adjuvant ชนิด oil-in-water emulsionใช้ใน influenza vaccine ที่พัฒนาโดยบริษัท Chiron Corporation (San Francisco, USA) เป็นวัคซีนที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ในระดับสูงและเป็นระยะเวลานานกว่าวัคซีนสูตรตำรับเดิม[14] จากการศึกษาพบว่า water-in-oil emulsions จะมีผลต่อการตอบสนองของระดับแอนติบอดี แต่ oil-in-water หรือ water-in-oil-in-water double emulsions อาจจะช่วยส่งเสริมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ด้วย นอกจากนี้ช่วงระยะเวลาของการตอบสนองยังขึ้นกับลักษณะของชนิด emulsion ที่ใช้[15] โดยทั่วไป emulsions จะชักนำการสร้างแอนติบอดีต่อ emulsified antigens แต่ไม่ใช่ตัวชักนำที่ดีต่อ CTL[16]



ภาพที่ 3 แสดงการเรียงตัวของ **emulsifier** บนผิวของน้ำที่แยกกระจายตัวออกมาจาก **oil** ใน **water-in-oil emulsion** และการเรียงตัวของ **emulsifier** บนผิวของ **oil** ที่แยกกระจายตัวออกมาจากน้ำ ใน **oil-in-water emulsion**

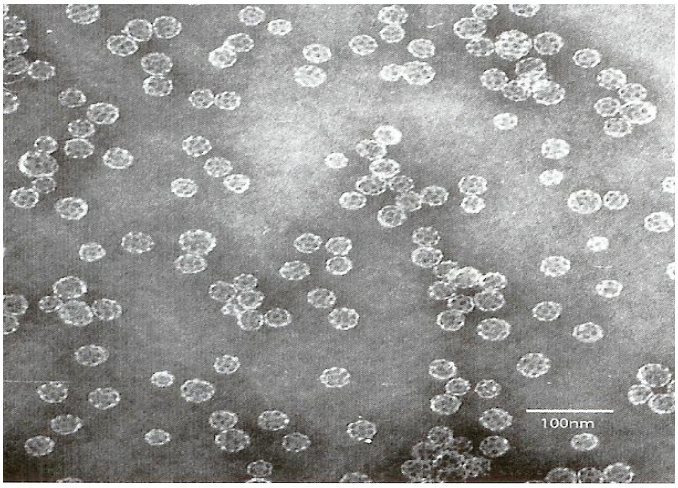
ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของ FCA

Compound	**Function**	**Lipid class**
Paraffin oil	Lipid phase (bulk phase)	I
Mannide monooleate	Emulsifier	III
Killed *Mycobacterium tuberculosis*	Adjuvant	-
Buffer	Aqueous phase (dispersed phase)	-
Antigenic material	‘Payload’	-

Particulate formulations based on a combination of lipid classes

Immune stimulating complexes (ISCOMs)

ISCOMs ถูกอธิบายขึ้นครั้งแรกโดย Morein และคณะในปี ค.ศ. 1984 [17] ว่ามีลักษณะทรงกลม โครงสร้างเหมือนกรง (cage-like structure) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 40 nm (ภาพที่ 4) ประกอบไปด้วย phospholipids, cholesterol, saponin adjuvant Quil A และแอนติเจน จากการวิจัยในสัตว์ทดลองพบว่า ISCOM™-based vaccines สามารถชักนำการสร้างภูมิคุ้มกันได้ดีทั้งแอนติบอดี และ CTL ซึ่งมีผลทั้งต่อ innate และ adaptive immune systems[18] ทั้งนี้เพราะ ISCOMs สามารถนำส่งแอนติเจนเข้าไปใน cytosol ของ APC ได้สะดวก[19] มีความพยายามพัฒนา ISCOM-based vaccines ตลอดช่วงระยะเวลา 20 ปีที่ผ่านมา ในช่วงแรกได้ทดลองใช้ในสัตว์ต่างๆ รวมทั้ง non-human primates และในช่วงหลังได้วิจัยเชิงลึกเพื่อให้แน่ใจถึงความเหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นวัคซีนสำหรับ คน[20] ตารางที่ 6 แสดงตัวอย่างการใช้ ISCOM-based vaccines ชนิดต่างๆ ในสัตว์ทดลองที่สามารถป้องกันการตายจาก homologous challenge ได้ และตารางที่ 7 แสดงการทดสอบในคน



ภาพที่ 4 ลักษณะของ **ISCOMs** ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ตารางที่ 6 การทดสอบ ISCOM-based vaccines ในสัตว์ทดลอง

Antigen	Animal model	Protection
HSV-2	หนู	รอด 80% จากการ challenge ด้วย HSV-2 และ 56% จาก HSV-1
HSV-1 glycoproteins	หนู	ป้องกันการแฝงตัวของไวรัสใน CNS ได้ 93%
H1N1 influenza	หนู	รอด100% จาก homologous challenge
H3N2 influenza	หนู	รอด 94-100% ขึ้นกับ dose
NY-ESO-1 (human tumor antigen)	หนู	ลดอุบัติการณ์เกิด tumor
Measles virus	หนู	รอด 100%
H5N1 influenza	ไก่	รอด 100%
SIV	ลิง	รอด 66-100% ขึ้นกับ dose
HIV-2	ลิง	ป้องกันได้บางส่วน

HSV, herpes simplex virus; CNS, central nervous system; SIV, simian immunodeficiency virus.

ตารางที่ 7 การทดสอบ ISCOM-based vaccines ในคน

Antigen	n	Responders (%)		
		Antibody	$CD4^+$ T cell	$CD8^+$ T cell
Influenza	850	>90	Not tested	25-80
NY-ESO-1	24	100	69	38
HPV E6E7 (1)	36	100	92	42
HPV E6E7 (2)	24	100	83	26
HCV core	24	96	75	25

HPV, human papilloma virus; HCV, hepatitis C virus.

สรุป

Particulate adjuvant systems สามารถจำแนกได้ตามคุณลักษณะโครงสร้าง (structural characteristics) หรือตามคุณลักษณะการทำงาน (functional characteristics) โดยที่ lipid based particulate systems เป็นหนึ่งในระบบการนำส่งแอนติเจนที่มีประสิทธิภาพที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในทางเภสัชเครื่องสำอาง ทางการแพทย์เพื่อการรักษา ตลอดจนการใช้ในวัคซีนเพื่อชักนำให้ร่างกายมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature 1998; 392: 245-52.

2. Kennedy RT. Meeting Report, 2nd meeting on novel adjuvants currently in/close to human clinical testing. World Health Organization-Organization Mondaile la Sante Foundation Merrieux, Annecy, France; 5-7 June 2000. Vaccine 2002; 20: 2155-63.

3. Schijns V. Mechanisms of vaccine adjuvant activity: initiation and regulation of immune responses by vaccine adjuvants. Vaccine 2003; 21: 829-31.

4. Small DM. Surface and bulk interactions of lipids and water with a classification of biologically active lipids based on these interactions. Federation Proc 1970; 29: 1320-26.

5. Olbrich C, Kayser O, Muller R. Solid lipid nanoparticles (SLN) as vaccine adjuvant-study in sheep with a Mycobacterium bovis antigen and stability testing. International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials; 2000, Paris, France. Paris: The Controlled Release Society, 2000.

6. Singh M, O'Hagan D. Recent advances in vaccine adjuvants. Pharm Res 2002; 19: 715-28.

7. Copland MJ, Baird MA, Rades T, et al. Liposomal delivery of antigen to dendritic cells. Vaccine 2003; 21: 883-90.

8. Cevc G, Schaltzlein A, Richardsen H, Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. Biochim Biophys Acta 2002; 1564: 21-30.

9. Walter E, Dreher D, Kok M, et al. Hydrophilic poly (DL–lactide–co-glycolide) micro-spheres for the delivery of DNA to human-derived macrophages and dendritic cells. J Control Release 2001; 76: 149-68.

10. Conacher M, Alexander J, Brewer JM. Niosomes as immunological adjuvants. In: Uchegbu I (ed) Synthetic Surfactant Vesicles. Singapore: International Publishers Distributors, 2000; 185-205.

11. Gluck R, Walti E. Biophysical validation of Epaxal Berna, a hepatitis A vaccine adjuvanted with immunopotentiating reconstituted influenza virosomes (IRIV). Dev Biol 2000; 103: 189-97.

12. Moser C, Metcalfe IC, Viret JF. Virosomal adjuvanted antigen delivery systems. Expert Rev Vaccines 2003; 2: 189-96.

13. Singh M, O'Hagan D. Advances in vaccine adjuvants. Nat Biotechnol 1999; 17: 1075-81.

14. Podda A. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine. Vaccine 2001; 19: 2673-80.

15. Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. Vaccine 2001; 19: 2666-72.

16. Gupta RK, Siber GR. Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. Vaccine 1995; 13: 1263-76.

17. Morein B, Sundquist B, Hoglund S, Dalsgaard K, Osterhaus A. Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. Nature 1984; 308:457-60.

18. Sjolander A, Drane D, Maraskovsky E, et al. Immune responses to ISCOM formulations in animal and primate models. Vaccine 2001; 19: 2661-5.

19. Villacres MC, Behboudi S, Nikkila T, Lovgren-Bengtsson K, Morein B. Internalization of iscom-borne antigens and presentation under MHC class I or class II restriction. Cell Immunol 1998; 185: 30-38.

20. Sanders MT, Brown LE, Deliyannis G, Pearse MJ. ISCOM^{TM}-based vaccines: the second decade. Immunol Cell Biol 2005; 83: 119-128.